# Transplantation xenogener Zellen nach Vorbehandlung der Empfängermäuse mit Endoxan im subletalen Bereich

Heda-Michaela Hellmann

1971

Aus dem Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg
Direktor: Prof. Dr. W. STICH

---

# TRANSPLANTATION XENOGENER ZELLEN NACH VORBEHANDLUNG DER EMPFÄNGERMÄUSE MIT ENDOXAN IM SUBLETALEN BEREICH

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heda-Michaela Hellmann
aus Bukarest/Rumänien

München 1971

1. Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. Stephan THIERFELDER
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Walter BRENDEL

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNI-Druck, 8 München 13, Amalienstraße 85

# GLIEDERUNG


| | Seite |
|---|---|
| EINLEITUNG | 1 |
| MATERIAL UND METHODEN | 5 |
| Verwendete Tiere | 5 |
| Vorbehandlung | 5 |
| Zelltransplantation | 6 |
| Untersuchung des Schimärenstatus | 7 |
| Hauttransplantation | 8 |
| Statistische Analyse der gewonnenen Ergebnisse | 8 |
| ERGEBNISSE | 9 |
| Subletale Empfängervorbehandlung mit Endoxan | 9 |
| I. Endoxankontrolle | 9 |
| II. Transplantation xenogener Zellen im Ratte-Maus-System | 11 |
| III. Transplantation allogener Zellen im Ratte-Ratte- und Maus-Maus-System | 14 |
| Letale Empfängervorbehandlung mit ionisierenden Strahlen | 17 |
| I. Schimärismus nach Transplantation von Rattenknochenmarkzellen | 17 |
| II. Immunologische Aktivität der Rattenknochenmark- und Rattenmilzzellen | 19 |
| Medikamentöse Vorbehandlung als Alternative zur Letalbestrahlung | 21 |
| I. Vorbehandlung mit 400 und 500 mg/kg KG Endoxan | 22 |

Seite

II. Endoxan und Antilymphocytenserum als Empfängervorbehandlung 24
III. Endoxan und Myleran als Empfängervorbehandlung 24

DISKUSSION 28

ZUSAMMENFASSUNG 38

LITERATURVERZEICHNIS 40

# GLIEDERUNG


| | Seite |
|---|---|
| EINLEITUNG | 1 |
| MATERIAL UND METHODEN | 5 |
| Verwendete Tiere | 5 |
| Vorbehandlung | 5 |
| Zelltransplantation | 6 |
| Untersuchung des Schimärenstatus | 7 |
| Hauttransplantation | 8 |
| Statistische Analyse der gewonnenen Ergebnisse | 8 |
| ERGEBNISSE | 9 |
| Subletale Empfängervorbehandlung mit Endoxan | 9 |
| I. Endoxankontrolle | 9 |
| II. Transplantation xenogener Zellen im Ratte-Maus-System | 11 |
| III. Transplantation allogener Zellen im Ratte-Ratte- und Maus-Maus-System | 14 |
| Letale Empfängervorbehandlung mit ionisierenden Strahlen | 17 |
| I. Schimärismus nach Transplantation von Rattenknochenmarkzellen | 17 |
| II. Immunologische Aktivität der Rattenknochenmark- und Rattenmilzzellen | 19 |
| Medikamentöse Vorbehandlung als Alternative zur Letalbestrahlung | 21 |
| I. Vorbehandlung mit 400 und 500 mg/kg KG Endoxan | 22 |

Seite

II. Endoxan und Antilymphocytenserum als Empfängervorbehandlung 24
III. Endoxan und Myleran als Empfängervorbehandlung 24

DISKUSSION 28

ZUSAMMENFASSUNG 38

LITERATURVERZEICHNIS 40

# EINLEITUNG

Die xenogene Transplantation bedeutet die Transplantation zwischen zwei Spezies im Gegensatz zu der allogenen Transplantation, wo innerhalb einer Spezie zwischen Partnern verschiedener Inzuchtstämme transplantiert wird, unter syngener Transplantation versteht man die Transplantation zwischen zwei Individuen mit gleicher genetischer Ausstattung.

In der vorliegenden Arbeit wurde hämopoetisches Gewebe aus Rattenknochenmark und Rattenmilz auf Mäuse transplantiert, in den allogenen Kontrollversuchen wurde hämopoetisches Gewebe zwischen inkompatiblen Mäusestämmen und Rattenstämmen transplantiert. Der Empfänger eines Knochenmarktransplantats muß immer immunsupressiv und zytostatisch vorbehandelt werden.

Die Mehrheit der Transplantationsversuche mit hämopoetischem Gewebe fand bisher bei Empfängern statt, die mit ionisierenden Strahlen vorbehandelt wurden. Dabei verwandte man fast immer eine letale Bestrahlungsdosis. Es sind hierbei folgende Gesetzmäßigkeiten herausgearbeitet worden:
Durch eine Bestrahlung in einem Bereich von ungefähr 900 - 1200 r sterben die Versuchstiere, in dem Fall Mäuse, innerhalb der ersten 30 Tage an einer Knochenmarkaplasie. Der "Knochenmarktod" kann verhindert werden, wenn man syngene Knochenmark- oder Milzzellen transplantiert (van BEKKUM 4).

Wenn die letalbestrahlten Empfänger mit allogenen Zellen geschützt werden, treten grundsätzlich zwei Phänomene auf:
Entweder sterben die Tiere innerhalb der ersten 20 Tage, oder sie überleben die aplastische Periode und sterben später an dem sogenannten "Sekundärsyndrom" (secondary disease). Diese zwei Phänomene kann man als Folge der immunologischen Reaktionen des Spenders gegen die Empfängerantigene deuten.

Mit der Übertragung von hämopoetischem Gewebe überträgt man auch immunkompetente Zellen, die die Empfängerantigene als fremd erkennen und gegen sie eine immunologische Reaktion starten. Sterben die Tiere sehr schnell

nach der Transplantation, so handelt es sich um eine akute Transplantatgegenwirtreaktion (graft-versus-host) Reaktion, die beim Nager von immunkompetenten Spenderzellen der Milz ausgelöst wird, bei der protrahierten Sterblichkeit handelt es sich um eine chronische Reaktion, wofür die immunologisch weniger wirksamen Spenderknochenmarkzellen verantwortlich sind.

Die wichtigsten Voraussetzungen für das Zustandekommen der Transplantatgegenwirtreaktion sind neben einer relativ großen Zahl immunkompetenter Zellen im Transplantat eine gewisse Mindestgröße der genetischen Differenz zwischen Spender und Empfänger sowie die Reduktion oder Aufhebung der immunologischen Abwehrfähigkeit des Empfängers, was, wie erwähnt, in den meisten Fällen mit Letalbestrahlung erreicht wurde.

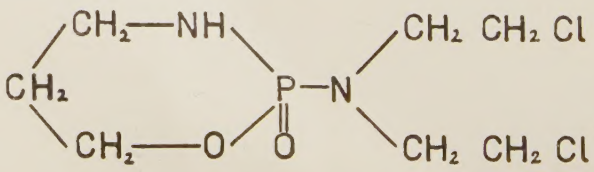
Die Tatsache, daß fremdes hämopoetisches Gewebe auf einem Empfänger anwächst, wird Schimärismus genannt, die Tiere, die eine fremde Zellpopulation aufweisen, nennt man Schimären. Der Begriff wurde von FORD geprägt (van BEKKUM 4, S. 143).

Die Letalbestrahlung ist mit einem verhältnismäßig großen technischen Aufwand verbunden, der insbesondere bei größeren Tieren oder bei Menschen deutlich wird. In diesen Fällen ist die Herstellung eines homogenen Bestrahlungsfeldes technisch schwierig. Außerdem ist eine Letalbestrahlung ein risikobelasteter Eingriff für den Organismus, denn bei Mißlingen der Transplantation würden die Tiere sterben.

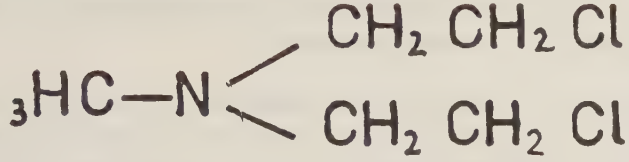
In letzter Zeit wurden deshalb Bemühungen unternommen, die Letalbestrahlung durch andere Vorbehandlungsmethoden zu ersetzen. In dieser Arbeit wurden in den meisten Versuchen die Empfänger mit einer subletalen Endoxandosis (Cyclophosphamid) vorbehandelt; subletal bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Empfänger auch ohne Transplantation von Zellen überleben würden.

Endoxan gehört zu den alkylierenden Substanzen, die in der Wirkungsweise durch die Hemmung der DNS-Synthese den ionisierenden Strahlen nahestehen.

Chemische Formel:



Es ist ein Derivat des Methyl-bis-ß-chloräthyamin (-N Lost):



Die Wirkung von Endoxan beruht auf einer Umwandlung in vivo durch die Abspaltung des zyklischen Phosphatringes in ein aktives Amin (BROCK).

Die Aktivierung erfolgt hauptsächlich in der Leber. Die aktive Wirkung verschwindet aus dem Serum bei Menschen nach 45 Minuten, bei Mäusen nach 60 Minuten (SANTOS 30).

Neben der cancerostatischen Wirkung besitzt Endoxan eine starke immunsupressive Wirkung auf den zellulären und humoralen Immunapparat (SANTOS 26).

Als Empfängervorbehandlung wurde es von SANTOS und seiner Arbeitsgruppe im allogenen System nach Transplantation von hämopoetischen Zellen systematisch untersucht. SANTOS transplantierte beispielsweise Milzzellen von gewebsunverträglichen Spendern auf Empfänger, die mit subletalen Endoxandosierungen vorbehandelt waren und löste, indem er durch die Vorbehandlung das Anwachsen der Zellen ermöglichte, eine akute Transplantatgegenwirtreaktion aus (SANTOS 27).

Die vorliegenden Versuche konzentrierten sich auf die Transplantation von xenogenen Rattenknochenmark- und Rattenmilzzellen auf Mäuse, die mit 300 mg/kg Endoxan vorbehandelt waren.

Die Untersuchung der Transplantation von xenogenen Zellen wurde in unserem Institut aus mehreren Gründen gewählt:

1. Die bisherigen Ergebnisse der xenogenen Transplantation beim Menschen zeigen, daß ein System "Affe - Mensch" in der Transplantationsimmunologie eingeführt werden könnte, zumindest in bezug auf die Nierentransplantation (REEMTSMA 25). Die ständige Präsenz von Antigenen für die Erhaltung einer Spender-Empfängertoleranz könnte in diesen Fällen durch eine Zelltransplantation vor der Organtransplantation verwirklicht werden.

2. Die nahe genetische Verwandtschaft zwischen Ratte und Maus läßt an die Möglichkeit denken, dieses System als experimentelles Modell für ein System "Affe - Mensch" aufzubauen.

3. Im Gegensatz zu anderen Spender-Empfängerkombinationen lassen sich im "Ratte - Maus" - System die Rattenleukozyten durch ihren Gehalt an alkalischer Phosphatase leicht von den Mäusezellen unterscheiden, die dieses Enzym nicht besitzen. Dadurch ist es leicht möglich, das Schicksal der Spenderzellen im Empfänger zu verfolgen.

Die Ergebnisse der xenogenen Transplantation bei einer subletalen Vorbehandlung der Empfänger wurden verglichen mit Ergebnissen der xenogenen Transplantation nach Letalbestrahlung der Empfänger sowie mit Ergebnissen der Transplantation von allogenen Zellen beim subletal vorbehandelten Empfänger.

Wie die Ergebnisse zeigen werden, war es nicht möglich, nach einer Vorbehandlung der Empfänger mit Endoxan in der Dosierung von 300 mg/kg KG mit xenogenen Zellen eine akute Transplantatgegenwirtreaktion auszulösen oder stabile Schimären zu bekommen. Diese Ergebnisse standen im Gegensatz zu den Ergebnissen, die man mit allogenen Zellen bekam.

Von dieser experimentellen Ausgangssituation habe ich dann versucht, die Bedingungen, die für das Angehen von hämopoetischen Zellen notwendig sind, zu analysieren. Außerdem habe ich versucht, auch im xenogenen System eine medikamentöse Vorbehandlung der Empfänger zur Annahme der xenogenen Zellen als Alternative zur Strahlenvorbehandlung auszuarbeiten.

# MATERIAL UND METHODEN

## Verwendete Tiere

- Mäuse vom Stamm CBA, $C_{57}$BL/6 (black), A/Jax sowie $F_1$ Mäuse (CBA X A/Jax) $F_1$ und (CBA X CBL) $F_1$.
  Die Mäuse waren durchschnittlich 10 bis 16 Wochen alt. Die $F_1$ Tiere, CBL und A/Jax Mäuse stammten aus eigener Institutszüchtung, die CBA Mäuse aus dem Jackson Laboratorium, USA.
- Ratten, 200 bis 300 g schwer, vom Sprague Dawley Stamm aus der Tierzucht Gassner, München, und BN Ratten aus dem pharmazeutischen Institut, München.

## Vorbehandlung

Die Vorbehandlung der Empfänger wurde durchgeführt:

- mit ionisierenden Strahlen. Das Gerät war eine Cäsiumlampe $Cs^{137}$ (Siemens 7 KCI, ohne Blende). Die Leistung war von 60 rad./min. Der Abstand der Mäuse von der Strahlenquelle betrug 50 cm.
- mit Endoxan (ASTA Werke). Die Substanz wurde in Aqua dest. oder physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und spätestens nach 20 Minuten i. p. injiziert. In den meisten Fällen erhielten die Mäuse 300 mg/kg KG, in einigen wenigen Fällen 400 oder 500 mg/kg KG.
- mit Endoxan und Myleran (Busulfan). Die Mylerantabletten von 2 mg wurden in der Porzellanschale zerrieben, in heißem absoluten Alkohol gelöst und als 12%ige wässerige Lösung gespritzt (Methode nach FLOERSHEIM 11).
  Die Mäuse erhielten außer Endoxan auch 40 mg/kg KG Myleran.

Zelltransplantation

Die Transplantation wurde mit Knochenmark- und Milzzellen durchgeführt. Spendetiere waren meistens Ratten, in einigen Fällen Mäuse. Die Zellen wurden nach der üblichen Labormethode präpariert (THIERFELDER 35).

Bei Ratten wurden die Femuren, die Tibiae und die Humeri von Muskeln frei präpariert. Mit Hilfe einer Knochenzange wurden die Knochen exartikuliert. Die Köpfchen wurden entfernt und die Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung aus dem Markraum gespült. Dazu verwendete man eine 10-ml-Spritze, die mit einer silikonierten 38er Nadel in den Markraum eingeführt wurde. Die 10-ml-Zellsuspension wurde durch ein Gazefilter in ein Reagenzglas filtriert. Anschließend zentrifugierte man die Flüssigkeit bei 4000 Umdrehungen pro Sekunde 10 Minuten lang, den Überstand goß man ab und den Bodenstand resuspendierte man in 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung. Jede Maus erhielt 0,3 ml davon i.v. in die Schwanzvene injiziert. Da man von jeder Ratte ungefähr 300 x $10^6$ Zellen gewinnen konnte, bekam jede Maus ungefähr 100 x $10^6$ Zellen. (Aus technischen Gründen war es nicht möglich, bei jedem Experiment die Zellen bei allen Ratten zu zählen.) Die Rattenmilz wurde in einer Petrischale in 10 ml Kochsalzlösung zerkleinert. Wie oben erwähnt, wurde die Flüssigkeit mit einer 10-ml-Spritze aufgezogen und in ein Reagenzglas filtriert. Anschließend zentrifugierte man die Zellsuspension und verfuhr wie bei den Knochenmarkzellen, um die zu injizierenden Zellen zu erhalten. Pro Rattenmilz zählte man ungefähr 360 x $10^6$ bis 400 x $10^6$ kernhaltige Zellen.

Die Zellen wurden entweder sofort transplantiert oder bei 4 $^{o}$C im Kühlschrank 1 bis 2 Stunden lang aufgehoben, was aber die Lebensfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigte (van BEKKUM 4, S. 57). In einigen Fällen wurden die Zellen mittels einer 0,2%igen Trypanblaulösung auf ihre Lebensfähigkeit geprüft (AMOS 2). 20 bis 25 % der Zellen färbten sich mit Trypanblau an, d. h. sie waren nicht mehr lebensfähig. Diese Zellzahl wurde von der gegebenen Zellzahl bei der Transplantation abgezogen. Die Mäuse erhielten also meistens 80 x $10^6$ Rattenknochenmarkzellen oder 100 x $10^6$ Rattenmilzzellen.

## Untersuchung des Schimärenstatus

Untersuchungen über den Schimärenstatus wurden mit folgenden Methoden durchgeführt:

- Hämagglutinationsmethode
- Chromosomenanalyse
- Alkalische Phosphatase-Färbung

Die Hämagglutinationsmethode wurde zur Untersuchung der Ratte-Maus-Schimären von MAKINODAN angewandt (18).
Hierfür stellte man ein Maus-Antirattenerythrocytenserum her. Die Mäuse erhielten zweimal wöchentlich 100 x $10^6$ Rattenerythrocyten 3 Wochen lang, anschließend wurde den Mäusen ein Ehrlich-Ascitestumor transplantiert, der uns vom Pathologischen Institut, München, zur Verfügung gestellt wurde. Das Serum wurde eine Woche nach der letzten Boosterung durch i.p. Punktion gewonnen (Titerhöhe 1 : 256 bis 1 : 512).
Von den vermutlichen Schimärenmäusen wurde Blut in heparinisierten Hämocytometerröhrchen aus dem retroorbitalen Plexus abgenommen, mit einem Tropfen Serum und einem Tropfen 5%iger EDTA-Lösung auf die Eindellung einer Glasplatte gemischt und mit einem Schüttelgerät 10 Minuten langsam horizontal gedreht.
Falls Rattenerythrozyten vorhanden waren, trat eine Agglutinationsreaktion ein. Als Kontrolle dienten ein Tropfen Mäuseblut mit dem Antirattenserum und ein Tropfen Rattenblut mit dem gleichen Antiserum.

Die Chromosomenanalyse wurde nur in wenigen Fällen durchgeführt.
Die Ausstriche wurden im Labor für Cytogenetik in unserem Institut hergestellt.
Die Rattenchromosomen unterscheiden sich deutlich von den Mäusechromosomen, so daß die Ausdifferenzierung im Lichtmikroskop leicht möglich ist.

Am systematischsten ist die Anzahl der alkalisch-Phosphatase-positiven Zellen untersucht worden. Naphtol-AS-Bi-Salz verbindet sich mit dem Enzym, die Verbindung Fast red violet geht eine Azo-Verbindung mit dem AS-Bi-Salz ein, die als rote, leuchtende Farbe unter dem Mikroskop erscheint (KAPLOW 15).

Das Enzym ist auf Rattengranulocyten lokalisiert. Einige Mäusezellen epithelialen Ursprungs färben sich auch an, diese sind allerdings morphologisch deutlich von den Rattengranulocyten zu unterscheiden (s. Bild 1 und Bild 2 im Anhang).

## Hauttransplantation

Um den Immunstatus der Schimären zu testen, wurden in einigen Fällen Hautstückchen transplantiert. Die transplantierte Rattenhaut stammte von 4 Wochen alten Ratten, da man bei diesen die Haut leichter präparieren konnte (Methode nach der Doktorarbeit von SCHIMMEL 1968 - unveröffentlicht).

Der Zustand der transplantierten Haut wurde am 8. Tag angesehen; falls die Haut angewachsen war, wurde der Verband gewechselt. 14 Tage nach der Transplantation wurde der Verband abgenommen. Die Haut wurde weiterhin ständig beobachtet.

## Statistische Analyse der gewonnenen Ergebnisse

Die Ergebnisse sind auf ihre Signifikanz mit der Man-Whytnay-Statistik (U-Test) getestet worden. Für die Signifikanz des Gewichtsverlaufes wurde der T-Test angewandt.

Als signifikant galten die Ergebnisse, bei denen $p \leq 0{,}05$ in einem zweiseitigen Test war (John G. PEATMAN 24).

# ERGEBNISSE

## Subletale Empfängervorbehandlung mit Endoxan

### I. Endoxankontrolle

Wirkung von 300 mg/kg KG Endoxan auf Empfängermäuse

Nach dieser Vorbehandlung starben von 9 CBA-Mäusen, 14 Wochen alt, 8 % am 18. Tag, d. h. 1 Maus.

6 (CBA x A) $F_1$-Mäuse, 14 Wochen alt, zeigten bei der gleichen Endoxandosierung keine Letalität auf.

Diese Tiere wurden zweimal wöchentlich gewogen; dabei stellte man eine geringe Gewichtsabnahme fest, die aber nach der statistischen Untersuchung mit dem T-Test nicht signifikant war.

Die Untersuchung der immunsupressiven Wirkung von Endoxan wurde im humoralen und zellulären System vorgenommen.

Die Fähigkeit zur humoralen Antikörperbildung wurde mit Schaferythrocyten getestet. Die Ergebnisse von jeweils 4 Mäusen sind gepoolt worden. Die Titerbestimmung erfolgte mit dem Hämagglutinationstest.

Die Immunisierung wurde mit $10^8$ Schaferythrocyten durchgeführt. Diese Menge wurde 4 Stunden, 7 und 14 Tage nach der Endoxanbehandlung gegeben. Die verwendeten Tiere, 4, 7 und 14 Wochen alte (CBA x A) $F_1$-Mäuse, hatten am 20. Tag keine Antikörper gebildet. Bei dem gleichen Immunisierungsvorgang zeigten unbehandelte (CBA x A) $F_1$-Mäuse, 14 Wochen alt, am 20. Tag einen Titer von 1 : 64.

Man konnte also schließen, daß die Unterdrückung des humoralen Immunapparates unabhängig vom Alter der Tiere war.

Die Unterdrückung der zellulären Immunabwehr wurde an der Fähigkeit der behandelten Mäuse, Rattenhaut abzustoßen, gemessen. Die Transplantate wurden eine Woche nach der Endoxanbehandlung gesetzt.

6 (CBA x A) $F_1$-Mäuse stießen die Rattenhauttransplantate zwischen dem 12. und 14. Tag ab. Im Kontrollversuch stießen unvorbehandelte Mäuse die Rattenhauttransplantate am 8. Tag ab.

Außer der immunsupressiven Wirkung besitzt Endoxan auch eine zytostatische Wirkung. Diese wurde an dem Verlauf der Zellularität der Milz, des Knochenmarks sowie der peripheren Leukozyten gemesse.

Die Werte der folgenden Tabelle sind Mittelwerte, die aus den Ergebnissen von jeweils 4 Mäusen stammen.

Tabelle 1: Zellzahl in der Milz, im Knochenmark und Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut nach einer einmaligen Endoxandosis von 300 mg/kg KG

| Zeitpunkt der Untersuchung nach Endoxan | Milzzellen x $10^6$ | Knochenmark-zellen x $10^6$ | Periphere Leukozyten x $10^6$/ml |
|---|---|---|---|
| 0 | 120 | 42 | 6,5 |
| 4 Std. | 111 | 41,5 | 7,36 |
| 24 Std. | 34 | 30 | 1,7 |
| 48 Std. | 8 | 25 | 1,7 |
| 1 Wo. | 48 | 32 | 2,5 |

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Tabelle, so stellt man fest, daß im untersuchten Zeitabschnitt die Milzzellzahl bis auf 7 % des Anfangswertes abgenommen hat, die Knochenmarkzellzahl nur auf 59,5 %. Die Leukozyten nahmen bis auf 25 % des Ausgangswertes ab. Nach einer Woche waren die Knochenmarkzellen auf 75 % des Ausgangswertes angestiegen, die Milzzellen nur auf 40 %. Die Erholung von Milzzellen war also langsamer als die Erholung von Knochenmarkzellen.

Man weiß aus Untersuchungen von van BEKKUM, daß die fremden hämopoetischen Zellen 24 bis 48 Stunden benötigen, bis sie das Knochenmark und die Milz des Empfängers zu besiedeln beginnen (Radiation Chimera, S. 59, van BEKKUM 4).

Daher erschien mir die Untersuchung der Werte 24 und 48 Stunden nach der Endoxanbehandlung wichtig, um dadurch eine Information über die Zellularität im Empfänger zum Zeitpunkt der Ansiedlung der transplantierten Zellen zu erhalten.

## II. Transplantation xenogener Zellen im Ratte-Maus-System

### Versuchsplan

44 Mäuse von den Stämmen CBA, (CBL x CBA) $F_1$, CBL, (CBA x A) $F_1$, erhielten 80 x $10^6$ Rattenknochenmarkzellen i. v. 4 bis 6 Stunden nach einer i. p. Injektion von 300 mg/kg KG Endoxan.
34 Mäuse von den Stämmen (CBA x CBL) $F_1$, CBA, (CBA x A) $F_1$ erhielten 100 x $10^6$ Rattenmilzzellen i. v. 4 - 6 Stunden nach einer i. p. Injektion mit der gleichen Dosis Endoxan.

Es wurden verschiedene Empfängerstämme transplantiert, um auszuschließen, daß die erhaltenen Ergebnisse nur für einen besonderen Stamm zutreffen.

Das Schicksal der transplantierten Zellen im Empfänger wurde durch die Untersuchung der immunologischen Aktivität der Spenderzellen sowie durch den Nachweis der Spenderzellen im Empfänger verfolgt.

Die immunologische Aktivität der Spenderzellen wurde an ihrer Fähigkeit untersucht, eine akute oder chronische Sekundärkrankheit im Empfänger auszulösen. Als Kriterium hierfür galten die Sterblichkeit, der Gewichtsverlauf und der klinische Aspekt der Mäuse.

Nach der Transplantation von Rattenknochenmarkzellen starben 2 von 44 Mäusen am 46. und 47. Tag.

Nach der Transplantation von Rattenmilzzellen starben 5 von 34 Mäusen zwischen dem 10. und 20. Tag.

Die Gewichtsabnahme der Mäuse in den ersten 2 Wochen war nicht signifikant im Vergleich zum Anfangsgewicht (Statistik mit dem T-Test). Danach nahmen die Tiere normal an Gewicht zu.

Der Aspekt der Mäuse zeigte keine der bekannten Zeichen einer Sekundärkrankheit: Sie hatten keine bucklige Haltung, der Gang war nicht verändert, sie hatten keine Dermatitis, und Durchfall wurde nicht beobachtet.

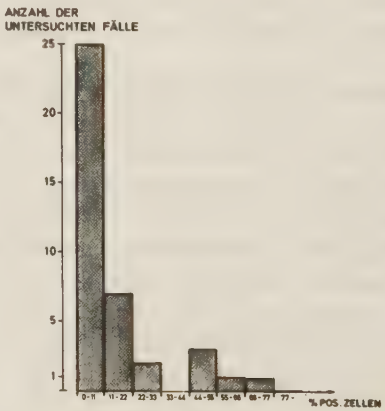
Selbst bei der Transplantation von vorsensibilisierten Rattenmilzzellen konnte man keine Sekundärkrankheit beobachten. Die Sensibilisierung der Ratten gegenüber Mäuseantigenen erfolgte durch eine zweimalige Injektion von $100 \times 10^6$ abgetöteten (CBA x CBL) $F_1$-Milzzellen, die im Abstand von einer Woche den Ratten i. p. gespritzt wurden. Bei den transplantierten (CBA x CBL) $F_1$-Mäusen, die $100 \times 10^6$ vorsensibilisierte Milzzellen erhalten haben, beobachtete man nur eine Mortalität von 1/6 am 6. Tag. Die gleiche Mortalität wurde in der Kontrollgruppe festgestellt, die nur unsensibilisierte Milzzellen in der gleichen Anzahl erhalten hatte.

Die Überlegungen, die zu diesem Versuch führten, werde ich in der Diskussion näher erläutern.

Der Nachweis der Spenderzellen nach der Transplantation von Rattenknochenmarkzellen zeigte, daß nur 39 der 44 transplantierten Mäuse zirkulierende Spenderzellen im peripheren Blut aufwiesen.

Bild 3:

Verteilung der positiven Rattenzellen, untersucht im peripheren Blut der Empfänger am 8. Tag (n = 39)



Die Verteilung der Rattenzellen am 8. Tag ist in Bild 3 dargestellt. Die Rattenzellen ließen sich nachweisen, ihr prozentueller Anteil an den zirkulierenden Zellen war jedoch gering. Am 15. Tag schließlich waren keine Rattenzellen im peripheren Blut der Empfänger nachweisbar.

Zur Kontrolle der Aussagekraft des Testes mit der alkalischen Phosphatase wurde bei 6 A/Jax-Mäusen der Heterohämagglutinationstest (siehe Material und Methoden) am 12. Tag durchgeführt. Das Ergebnis war negativ, d. h. Rattenerythrocyten waren im Empfänger nicht mehr vorhanden.

Nach der Transplantation von Rattenmilzzellen konnte man weder am 8. noch am 15. Tag Spenderzellen nachweisen. Auch die bei 3 Mäusen am 12. Tag durchgeführte Chromosomenanalyse zeigte keine Rattenchromosomen im Empfängerknochenmark. Diese Gruppe unterschied sich nicht von einer Kontrollgruppe, in welcher 6 CBA-Mäuse Rattenknochenmark erhielten, ohne vorbehandelt zu werden. Bei diesen Mäusen konnte man keine Spenderzellen am 8. Tag nachweisen.

Die Annahme der Rattenzellen konnte nicht verbessert werden durch eine Kombination von Rattenknochenmark- und Rattenmilzzellen, wie man aus dem Vergleich der zirkulierenden Rattenzellen im Empfänger ersieht.

Bei 6 (CBA x A) $F_1$-Mäusen, die 80 x $10^6$ Rattenknochenmarkzellen erhalten hatten, war der prozentuelle Anteil der alkalisch phosphatase-positiven Zellen am 8. Tag: 60%, 20%, 10%, 0%, 0%, 0%.
Als man 60 x $10^6$ Rattenmilzzellen zu den Knochenmarkzellen zusetzte, war der Unterschied im prozentuellen Anteil der alkalisch phosphatase-positiven Zellen nach dieser Transplantation nicht signifikant. In diesem Fall war der prozentuelle Anteil an Rattengranulocyten: 40%, 30%, 10%, 7%, 4%, 2% ($p \geqq 0{,}05$).

Durch eine Antigenvorgabe vor der Transplantation konnte man die Annahme der Rattenzellen am 8. Tag zwar verbessern, aber nicht verhindern, daß sie innerhalb der ersten 15 Tage abgestoßen wurden.

Bei 8 (CBA x A) $F_1$-Mäusen, die 100 x $10^6$ abgetötete Rattenmilzzellen i.p. 24 Stunden vor der 300 mg/kg-KG-Endoxandosis erhielten, war der prozentuelle Anteil der positiven Zellen am 8. Tag der folgende: 86%, 56%, 36%, 30%, 20%, 8%, 5%, 4%.
Bei 8 (CBA x A) $F_1$-Mäusen, die ohne Antigenvorgabe transplantiert wurden, sah die Verteilung der positiven Zellen am 8. Tag folgendermaßen aus: 16%, 12%, 10%, 4%, 2%, 1%, 0%, 0% ($p \leqq 0{,}05$).

Am 15. Tag sind alle Mäuse "Reversals", d. h. daß die Spenderzellen abgestoßen waren und der Hämopoesetyp vom Empfänger stammte.

Der Spenderzellnachweis bestätigte den klinischen Eindruck, daß die gute Überlebenszeit der Mäuse nicht durch eine besonders gute Immunsupression der Empfänger bedingt war, sondern durch eine Abstoßung des Transplantates bewirkt wurde.

Die Frage, ob die Empfänger durch die Abstoßung der Rattenzellen gegen Rattenantigene sensibilisiert worden sind, wurde im humoralen und zellulären Immunsystem der Empfänger untersucht. Folgende Versuche wurden hierfür durchgeführt:

10 Tage nach der Transplantation von Rattenknochenmarkzellen wurden 6 CBA-Mäuse mit 100 x $10^6$ Rattenerythrocyten i.p. geboostert. 4 und 6 Tage danach hatten die Mäuse keine Antikörper gegen Rattenerythrocyten gebildet, wie man es im Hämagglutinationstest ersehen konnte. Das humorale System war also durch die Abstoßung nicht sensibilisiert worden.

Als Kriterium der zellulären Immunabwehr wurde die Abstoßungszeit einer transplantierten Rattenhaus untersucht. Die Rattenhaut wurde, wie oben dargestellt, am 10. Tag nach der Zelltransplantation bei 6 CBA-Mäusen gesetzt. Die Haut wurde 14 Tage nach ihrer Transplantation abgestoßen. Sie wurde also länger akzeptiert als bei 5 Kontrollmäusen, die ohne Vorbehandlung die Haut bereits am 8. Tag abstießen. Also war der zelluläre Immunapparat durch die Abstoßung der Rattenzellen auch nicht sensibilisiert worden.

## III. Transplantation allogener Zellen im Ratte-Ratte- und Maus-Maus-System

### Ratte-Ratte-System

12 Ratten (BN-Stamm) erhielten 225 mg/kg KG Endoxan., 4 - 6 Stunden danach wurden sie mit 100 x $10^6$ Sprague-Dawley Rattenmilzzellen transplantiert. 10 von diesen 12 Ratten starben in den ersten 20 Tagen mit dem typischen Zeichen einer Sekundärkrankheit, so wie sie von SANTOS und BALNER beschrieben wurden: starke Dermatitis, reduzierter Allgemeinzustand, Haarausfall, bucklige Haltung, aber im Gegensatz zu kranken Mäusen keinen Durchfall (SANTOS 27 und BALNER 3).

Im Bild 4 (siehe Anhang) erkennt man die kranke Ratte (links) neben der gesunden Kontrollratte. Bei der kranken Ratte sieht man eine starke Dermatitis im Gesichtsbereich, perioral und periorbital, außerdem eine Aufhellung auf dem Rücken, die einem starken Haarausfall entspricht. Die bucklige Haltung der kranken Ratte kann man aus dem folgenden Bild (Bild 5) ersehen.

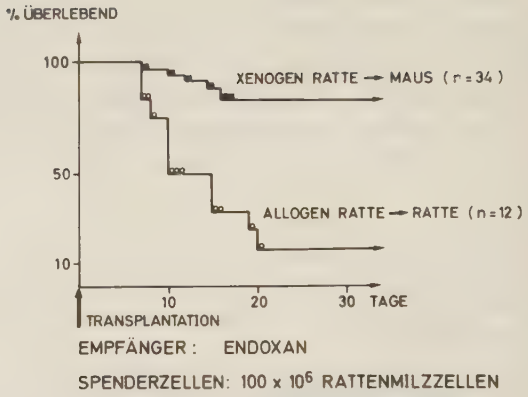
Bild 5:

Typische Haltung
einer Ratte mit
Sekundärkrankheit

Die Sterblichkeit der Ratten mit Sekundärkrankheit ist anhand einer Kurve (Bild 6) aufgezeichnet worden. Vergleichend ist die Sterblichkeit der Mäuse aufgezeichnet worden, die nach einer subletalen Endoxanbehandlung xenogene Milzzellen transplantiert bekamen.

Bild 6:

Vergleichende Überlebensrate im xenogenen und allogenen System




Wie die Kurven zeigen, überlebten im allogenen System nur 16,6 % der Empfänger, während im xenogenen System 88 % überlebten.

Um auszuschließen, daß die Ratten nicht infolge der Endoxanbehandlung allein gestorben waren, wurden 6 BN-Ratten mit 225 mg/kg KG Endoxan behandelt. Sie erhielten kein Zelltransplantat. Nur eine der 6 Ratten starb, was einer Überlebensrate von 73,4 % entspricht. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die transplantierten Ratten nicht infolge einer letalen Vorbehandlung mit anschließender Abstoßung des Transplantates gestorben waren.

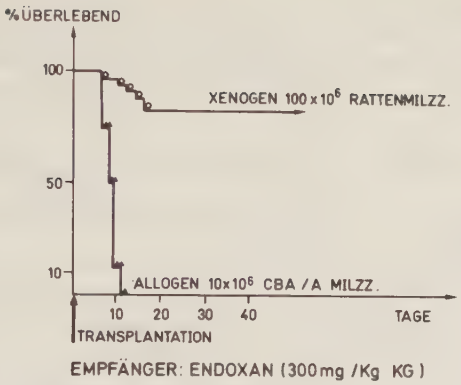
Maus-Maus-System

Semiallogene Mausmilzzellen von (CBA x A) $F_1$-Mäusen wurden auf Endoxan vorbehandelte (CBL x CBA) $F_1$-Empfänger transplantiert. Spender und Empfänger unterschieden sich an einem $H_2$-Locus, dem Hauptinkompatibilitätslocus bei der Maus.

8 (CBA x CBL) $F_1$-Mäuse erhielten 4 Stunden nach 300 mg/kg KG Endoxan 10 x $10^6$ (CBA x A) $F_1$-Milzzellen. Die Empfänger starben innerhalb der ersten 14 Tage.

Bild 7:

Vergleichende Überlebensrate im xenogenen und allogenen System




Wie diese Kurven zeigen, starben alle Mäuse im allogenen System, während die Empfänger der xenogenen Zellen zu 88 % überlebten.

## Letale Empfängervorbehandlung mit ionisierenden Strahlen

Das Unvermögen der mit einer subletalen Endoxandosis vorbehandelten Empfänger, über längere Zeit Rattenzellen anzusiedeln, warf die Frage nach der Proliferationsfähigkeit xenogener Zellen in letalbehandelten Empfängern auf. Aus diesem Grunde wurde die Endoxanvorbehandlung mit einer Strahlenvorbehandlung der Empfängertiere verglichen.

### I. Schimärismus nach Transplantation von Rattenknochenmarkzellen

Bestrahlungskontrolle

Da die Bestrahlung zu den Routinemethoden in unserem Labor gehört, wurden nur 3 Mäuse vom CBA-Stamm mit 900 r bestrahlt und nicht weiter behandelt. 2 Mäuse starben am 9. Tag, 1 Maus starb am 14. Tag. Untransplantierte Mäuse überlebten also nicht die Dosis von 900 r.

Schimärenstatus

In folgender Tabelle (Tabelle 2) wird gezeigt, daß Rattengranulocyten sogar am 60. Tag nach der Transplantation noch im Empfänger vorhanden sind.

Tabelle 2

| EMPFANGER 900r BESTRAHLT | TAG | % VOLLSTÄNDIGE CHIMÄREN | % TEILCHIMÄRE | % REVERSALS |
|---|---|---|---|---|
| 22 CBA | 12. | 100 | 0 | 0 |
| 18 CBA | 20 | 100 | 0 | 0 |
| 7 CBA | 30. | 85 | 14,2 | 0 |
| 6 CBA | 60. | 33,3 | 66,6 | 0 |
| 7 CBA | 150 | 0 | 0 | 100 |
| 12 (CBA×CBL)$F_1$ | 12. | 100 | 0 | 0 |
| 20 (CBA×CBL)$F_1$ | 20 | 100 | 0 | 0 |

VERLAUF DER ALKALISCHE - PHOSPHATASE POSITIVEN ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT NACH SUPRALETALBESTRAHLUNG DES EMPFÄNGERS UND TRANSPLANTATION VON $80 \times 10^6$ RATTENKNOCHENMARKZELLEN

Man sieht, daß 2 von 6 CBA-Mäusen am 60. Tag ausschließlich Rattengranulocyten im peripheren Blut besaßen, d. h. sie waren vollständige Schimären, 4 von diesen Mäusen besaßen eine gemischte Population aus Ratten- und Mäusegranulocyten, d. h. sie waren Teilschimären. Die Ergebnisse waren aus mehreren Versuchen gepoolt worden. Deswegen variiert die Anzahl der Versuchstiere. Die (CBA x CBL) $F_1$-Mäuse sind viel schneller gestorben als die CBA-Mäuse; deshalb konnten die Rattenzellen nur kurzfristig im peripheren Blut der Empfänger nachgewiesen werden.

Unter den Versuchsbedingungen der Letalbestrahlung war es also möglich, langlebige Ratte-Maus-Schimären herzustellen.

Als weiterer Beweis für den Schimärenstatus der Mäuse galten die Ergebnisse der Rattenhauttransplantation.

Bei 5 CBA-Mäusen, die sich 30 Tage nach Bestrahlung und Transplantation von Rattenknochenmarkzellen im Schimärenstatus befanden, wurden Ratten-

hautstückchen transplantiert. 3 Mäuse hiervon stießen die Haut nach 30 Tagen ab, also am 60. Tag nach der Transplantation, 2 starben am 65. Tag mit intakter Rattenhaut.

## II. Immunologische Aktivität der Rattenknochenmark- und Rattenmilzzellen

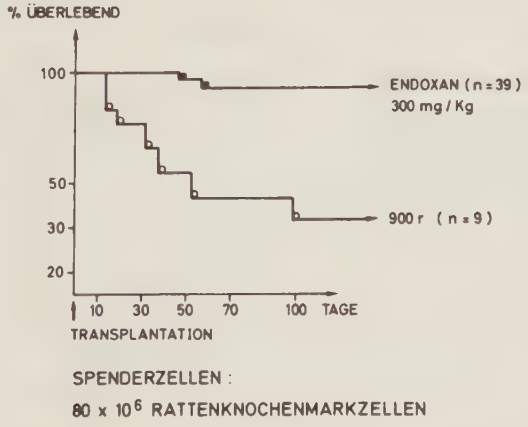
### Rattenknochenmarkzellen

Die protrahierte Sterblichkeit, die nach der Transplantation von 80 x $10^6$ Rattenknochenmarkzellen auftrat, wurde als Hinweis für eine immunologische Auseinandersetzung zwischen Spender- und Empfängerzellen hingenommen, wie man es aus dem nächsten Versuch ersieht.

9 CBA-Mäuse wurden mit 900 r bestrahlt. 24 Stunden danach erhielten sie Rattenknochenmarkzellen. Hiervon überlebten nur 3 Mäuse 200 Tage, als der Versuch aufgelöst wurde. Diese Ergebnisse sind im Bild 8 dargestellt.

Bild 8:

Vergleichende Überlebensrate nach Vorbehandlung mit Endoxan oder Bestrahlung



Auf diesem Bild wurde die Überlebensrate der Mäuse, die die gleiche Knochenmarkzellzahl nach einer subletalen Endoxanvorbehandlung erhalten hatten, ebenfalls dargestellt. Aus der sehr geringen Sterblichkeit der mit Endoxan vorbehandelten Mäuse, im Gegensatz zu den bestrahlten Mäusen, entnimmt man keine Anhaltspunkte für eine immunologische Auseinandersetzung zwischen Spender- und Empfängerzellen.

Rattenmilzzellen

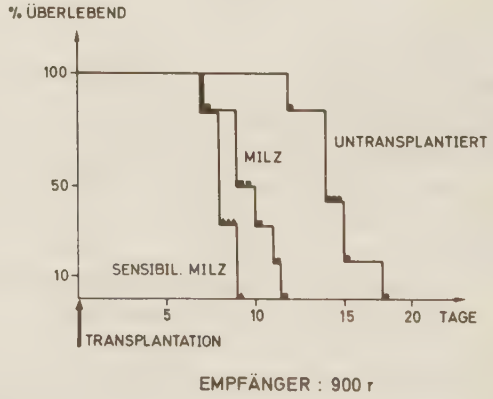
Die Immunkompetenz der Rattenmilzzellen wurde an der sehr kurzen Überlebenszeit der bestrahlten und transplantierten Mäuse nachgewiesen. Hier wurde folgender Versuch durchgeführt:

18 CBA x CBL-Mäuse wurden mit 900 r letal bestrahlt. Man teilte sie dann in 3 Gruppen ein. Eine davon war die Kontrollgruppe. Eine Gruppe erhielt 100 x $10^6$ Rattenmilzzellen und die letzte Gruppe 100 x $10^6$ vorsensibilisierte Rattenmilzzellen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind im Bild 9 aufgezeichnet.

Bild 9:

Vergleichende Überlebensrate nach Transplantation von Milzzellen und sensibilisierten Milzzellen




Wie man sieht, starben die Empfänger von Rattenmilzzellen sogar noch eher als die tödlich bestrahlten und transplantierten Kontrollmäuse. Die Transplantatgegenwirtreaktion konnte durch eine vorausgegangene Sensibilisierung der Spenderzellen gegen die Empfängerantigene verstärkt werden.

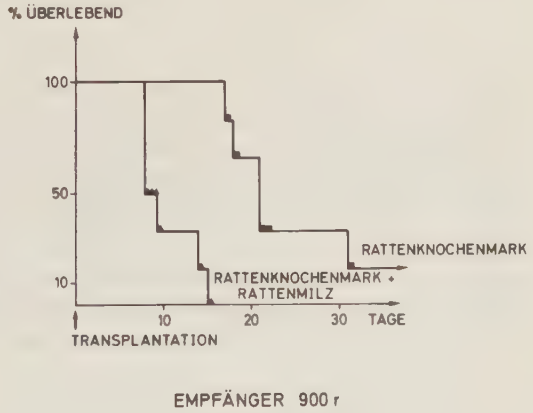
Die Empfänger der sensibilisierten Zellen starben schneller als die Mäuse, die unsensibilisierte Zellen erhalten hatten. Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen war signifikant ($p \leqq 0,02$).

Nach der Transplantation von Milzzellen waren im peripheren Blut am 8. Tag keine alkalisch Phosphatase-positiven Zellen vorhanden. Möglicherweise ist die Myelopoese der Milz zu schwach, um innerhalb so kurzer Zeit reife Granulocyten in die Peripherie auszuschütten.

Ebenfalls für die Immunkompetenz der Milzzellen sprach die verstärkte Mortalität von (CBA x CBL) $F_1$-Mäusen, die neben 80 x $10^6$ Rattenknochenmarkzellen auch 60 x $10^6$ Rattenmilzzellen erhalten haben. Die Überlebenskurve dieser Mäuse ist im Bild 10 dargestellt. Vergleichend hierzu ist in diesem Bild auch die Überlebenskurve von Mäusen aufgezeichnet, die nur Rattenknochenmarkzellen erhalten haben.

Bild 10:

Vergleichende Überlebenskurve nach Transplantation von Rattenknochenmark- und Rattenknochenmark- und Rattenmilzzellen




Zusammenfassend zeigt die Tabelle 3 die kumulative Mortalität in Prozent nach Transplantation von Rattenknochenmark- und Rattenmilzzellen.

Tabelle 3

| STAMM | ZAHL | BEHANDLUNG | %KUMULATIVE MORTALITÄT Tage nach Transplantation | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| CBA/CBL | 6 | 900r | 0 | 0 | 86 | 100 | | | | |
| CBA/CBL | 6 | 900r+120x$10^6$RM | 0 | 66 | 100 | | | | | |
| CBA/CBL | 6 | 900r+ 120x$10^6$sens. RM | 0 | 100 | | | | | | |
| CBA/CBL | 6 | 900r+80x$10^6$RKM+60x$10^6$sens RM | 0 | 66 | 100 | | | | | |
| CBA/CBL | 6 | 900r+ 80x$10^6$RKM+120x$10^6$RM | 0 | 0 | 86 | 100 | | | | |
| CBA/CBL | 6 | 900+80x$10^6$ RKM | 0 | 0 | 0 | 33 | 66 | 66 | 83 | 83 |

Aus dieser Tabelle kann man nochmal ersehen, daß die Mäuse, die vorsensibilisierte Zellen erhalten haben, am schnellsten starben und daß die Gabe von Milzzellen zu einer üblichen Knochenmarktransplantation die Transplantatgegenwirtreaktion, gemessen an der Letalität der Empfänger, verstärkt hat. Dabei scheint nicht die größere Zellzahl alleine eine Rolle gespielt zu haben, sondern die Stärke der immunkompetenten Zellen, denn die Mäuse, die vorsensibilisierte Milzzellen zu der üblichen Knochenmarkdosis bekommen haben, starben früher als die Mäuse, die zusätzlich 120 x $10^6$ nichtsensibilisierte Milzzellen erhalten haben.

## Medikamentöse Vorbehandlung als Alternative zur Letalbestrahlung

Da nach einer Letalbestrahlung der Empfänger das Angehen von xenogenen Zellen möglich war, wurde versucht, ob durch Ersetzen der subletalen Endoxandosis in der Vorbehandlung der Empfänger mit einer höheren und somit toxischeren Endoxandosis das Anwachsen xenogener Zellen ermöglicht werden könnte.

I. Vorbehandlung mit 400 mg/kg KG und 500 mg/kg KG Endoxan

Die Endoxandosis von 400 mg/kg KG entspricht nach den Literaturangaben einer LD 50 (SANTOS 29).

Der Versuchsplan war der gleiche wie bei der Vorbehandlung mit 300 mg/kg KG Endoxan. Transplantiert wurden 3 CBA- und 5 (CBA x A) $F_1$-Mäuse. Der Anteil der alkalischen Phosphatase-positiven Zellen im peripheren Blut am 8. Tag war: 70%, 60%, 50%, 50%, 50%, 50%, 20%, 10%.
Diese Werte waren signifikant höher als nach 300 mg/kg KG Endoxan ($p \leqq 0,002$).

Die Letalität der Mäuse betrug 87% in den ersten 15 Tagen.

Nach Vorbehandlung mit 400 mg/kg KG Endoxan und Transplantation von 100 x $10^6$ Rattenmilzzellen wurde in einer Beobachtungszeit von 60 Tagen keine Letalität festgestellt, was wir uns nicht erklären konnten.

Die Ergebnisse nach Vorbehandlung der Empfänger mit 500 mg/kg KG Endoxan war auch nicht eindeutig.

In der üblichen Versuchsanordnung erhielten 14 (CBA x A) $F_1$-Mäuse 80 x $10^6$ Rattenknochenmarkzellen. Der Anteil der positiven Zellen in der Peripherie der Empfänger war am 8. Tag: in neun Fällen 100%, 50%, 40%, 30%, 10%, 0%.

Diese Werte waren signifikant höher als nach 300 mg/kg KG ($p \leqq 0,001$) und nach 400 mg/kg KG Endoxan ($p \leqq 0,002$).

In diesem Versuch betrug die Mortalität 71% in den ersten 15 Tagen.
Die 4 überlebenden Mäuse waren "Reversals", d. h. in der Peripherie waren nur noch Mäusezellen vorhanden. Die Letalität von Mäusen, die bei der gleichen Vorbehandlung Rattenmilzzellen transplantiert bekamen, betrug hingegen nur 50%.

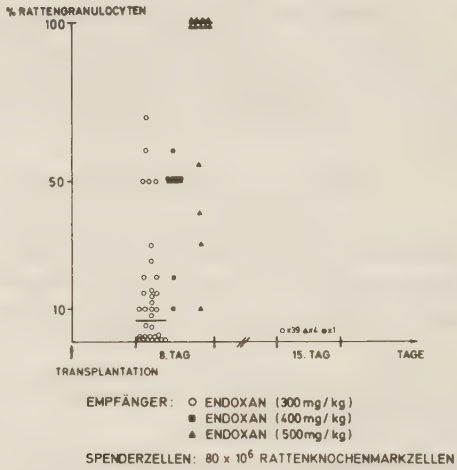
Warum die Mäuse nach Transplantation von Rattenmilzzellen eine geringere Mortalität als nach Transplantation von Rattenknochenmarkzellen aufwiesen, wurde nicht weiter untersucht.
Was mir wesentlich erschien, war das viel bessere Anwachsen der xenogenen Knochenmarkzellen nach der höheren Endoxandosierung sowie die Tatsache,

daß diese Zellen sehr schnell abgestoßen wurden. Am 15. Tag waren die Mäuse unabhängig von der Vorbehandlung "Reversals".

Die Verteilung der positiven Zellen nach diesen Vorbehandlungsdosierungen wurden im nächsten Bild (Bild 11) graphisch dargestellt.

Bild 11:

% Rattengranulocyten nach Transplantation von Rattenknochenmarkzellen




Trotz Erhöhung der Endoxandosis konnte man also keine langlebigen Schimären herstellen, d. h die Spenderzellen zirkulierten auch bei mit Höchstdosen Endoxan vorbehandelten Empfängern wesentlich kürzer, als wenn man die Empfänger mit Bestrahlung vorbehandelt hatte.

Wir dachten zunächst an die Möglichkeit einer ungenügenden Immunsupression selbst bei diesen hohen Endoxandosierungen. Deshalb wurde in der Empfängervorbehandlung Endoxan mit KAMLS *) wegen seiner starken Immunsupression kombiniert.

---

*) Kaninchenantimauslymphocytenserum

II. Endoxan und Antilymphocytenserum als Empfängervorbehandlung

Als Kontrolle wurden zunächst 6 (CBA x A) $F_1$-Mäuse mit 0,25 ml ALS i.p. 6 Tage lang vorbehandelt und anschließend mit Rattenknochenmarkzellen transplantiert. Am 8. Tag konnte man keine Spenderzellen im Empfänger nachweisen.

Im Hauptversuch erhielten 8 (CBA x A) $F_1$-Mäuse täglich 0,25 ml ALS i.p. 6 Tage lang. 3 Tage später wurden sie mit 300 mg/kg KG Endoxan vorbehandelt und anschließend mit 80 x $10^6$ Rattenknochenmarkzellen transplantiert. Es wurde keine Letalität beobachtet.

Der Verlauf der Transplantation unterschied sich nicht signifikant vom Verlauf der Transplantation nach der Vorbehandlung mit Endoxan alleine. Der Verlauf der alkalischen Phosphatase-positiven Zellen am 8. Tag war:
50%, 25%, 20%, 16%, 15%, 10%, 0%, 0%.
Die gleichzeitig nur mit Endoxan vorbehandelten Mäuse hatten am 8. Tag folgenden Anteil an Spenderzellen: 20%, 16%, 10%, 8%, 4%, 0%.
Der Unterschied der beiden Gruppen war nicht signifikant.

Die graphische Aufzeichnung dieser Ergebnisse entnimmt man aus Bild 12.

Die erfolglose Erhöhung der immunsupressiven Wirkung von Endoxan mit ALS sprach also gegen die ungenügende Immunsupression des Endoxans allein zur Vorbereitung des Empfängers auf die Transplantation von xenogenen hämopoetischen Zellen. Deshalb wurde Endoxan mit Myleran kombiniert, das besonders zytotoxisch, aber wenig immunsupressiv wirksam ist.

III. Endoxan und Myleran als Empfängervorbehandlung

Kontrollversuche mit Myleran

Daß die gegebene Mylerandosis von 40 mg/kg KG keine wesentliche immunsupressive Wirkung besitzt, wurde im folgenden Versuch gezeigt.

6 (CBA x A) $F_1$-Mäuse erhielten 4 Stunden nach 40 mg/kg KG Myleran 30 x $10^6$ (CBA x CBL) $F_1$-Milzzellen. Da die Mäuse keine Letalität aufwie-

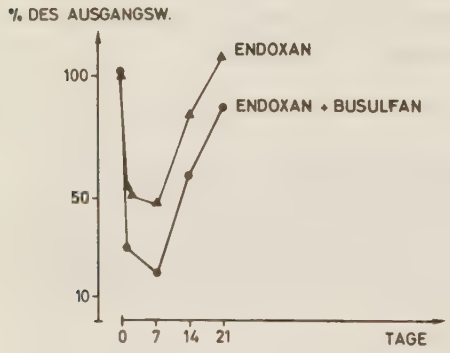
sen und auch sonst keine Zeichen einer Sekundärkrankheit beobachtet wurden, konnte man annehmen, daß die inkompatiblen Spendermilzzellen abgestoßen wurden.

Nach der gleichen Vorbehandlung transplantierte ich Rattenknochenmarkzellen auf 6 (CBA x A) $F_1$-Empfänger. Der Spenderzellnachweis am 8. Tag war negativ.

Die Kombination von 300 mg/kg KG Endoxan mit 40 mg/kg KG Myleran erwies sich als subletal für die Empfänger.
11 (CBA x A) $F_1$-Mäuse zeigten bei dieser Vorbehandlung keine Letalität.

Die Untersuchung des peripheren Blutbildes nach Endoxan und Myleran zeigte, daß die Leukopenie ausgeprägter war als nach einer Vorbehandlung der Mäuse nur mit Endoxan, wie man aus folgendem Bild (Bild 12) sieht.

Bild 12:



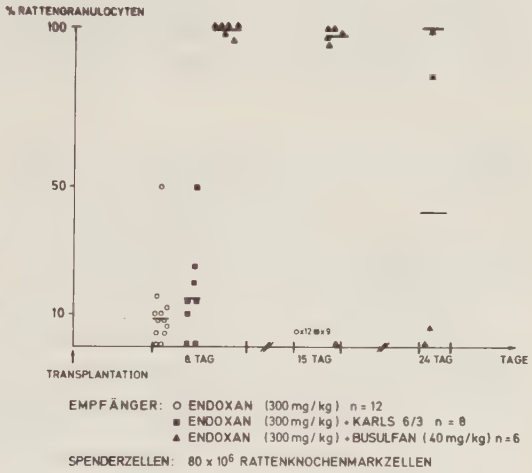

LEUKOCYTEN nach ENDOXAN (300 mg/Kg)
und BUSULFAN (40 mg/Kg)

Hauptversuche

Die Kombinationsbehandlung von Endoxan und Myleran führte dann tatsächlich zu einem besseren Angehen der Rattenzellen im Empfänger, wie man es aus dem nächsten Bild sieht.

Bild 13:

% Rattengranulocyten nach Transplantation von Rattenknochenmarkzellen




Das Bild zeigt den prozentuellen Anteil der Rattengranulocyten nach der Behandlung mit Endoxan und Myleran, verglichen mit dem Anteil dieser Zellen nach der Behandlung mit Endoxan alleine und Endoxan in Kombination mit ALS. Nach Endoxan mit Myleran waren am 8. Tag im peripheren Blut der Empfänger 100% Spenderzellen, am 24. Tag waren gleichfalls Spenderzellen noch nachweisbar. Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen war signifikant, ($p \leq 0{,}001$), d. h. bei Endoxan mit Myleran vorbehandelten Mäusen war der Spenderzellanteil wesentlich höher als in den beiden anderen Gruppen. Nicht signifikant war dagegen der Unterschied zwischen der "ALS-Gruppe" und der "Endoxan-Gruppe".

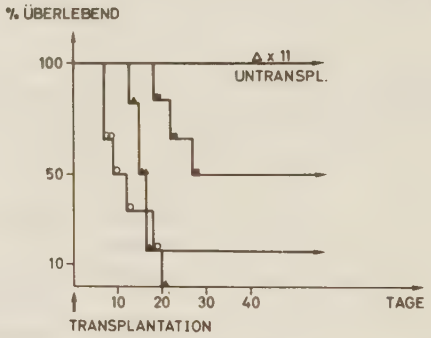
Nachdem die Kombination von Endoxan mit Myleran zu einem besseren Anwachsen der xenogenen Zellen im Empfänger führte, mußte man erwarten, daß die angegangenen Zellen im Empfänger auch immunologisch wirksam würden.

Aus dem nächsten Bild (Bild 14) sieht man, daß nach der Transplantation von Rattenmilzzellen eine akute Sterblichkeit auftrat, nach der Transplantation von Rattenknochenmarkzellen ist eine protrahiertere Sterblichkeit feststellbar.

In diesem Versuch wurden Gruppen von 6 (CBA x A) $F_1$-Mäusen nach der Vorbehandlung mit Endoxan und Myleran (Busulfan) transplantiert.
Wie in dieser Arbeit schon erwähnt, hatten bei der Transplantation von Milzzellen auf Endoxan-vorbehandelte Empfänger 84 % der Mäuse überlebt.

Bild 14:

Transplantationsergebnisse nach Vorbehandlung mit Endoxan und Myleran




EMPFÄNGER : ENDOXAN (300 mg/Kg) + BUSULFAN (40 mg/Kg)

SPENDERZELLEN: ■ 80 x $10^6$ RATTENKNOCHENMARKZELLEN
▲ 80 x $10^6$ RATTENKNOCHENMARKZELLEN + 60 x $10^6$ RATTENMILZZELLEN
○ 100 x $10^6$ RATTENMILZZELLEN

Nach diesen Versuchen kann man folgern, daß die xenogene Transplantation hämopoetischer Zellen auf Endoxan-vorbehandelte Empfänger dann möglich wird, wenn Endoxan mit Myleran kombiniert wird, d. h. wenn man die zytostatische Wirkung der gegebenen Endoxandosis von 300 mg/kg KG durch die von 40 mg/kg KG Myleran (Busulfan) erhöht.

# DISKUSSION

Die Ergebnisse der erwähnten Versuche haben gezeigt, daß nach einer subletalen Vorbehandlung der Empfänger mit Endoxan die xenogenen Zellen im Gegensatz zu den allogenen Zellen nicht anwachsen konnten und immunologisch nicht aktiv wurden.

Bei der Transplantation von allogenen Zellen wurden übereinstimmende Ergebnisse mit den Ergebnissen der Literatur erzielt (SANTOS 30) und deswegen nur eine geringe Anzahl von Versuchen durchgeführt.

Im xenogenen System, bei der gleichen Vorbehandlung der Empfänger, berichteten OWENS und seine Arbeitsgruppe über das Anwachsen von $70 \times 10^6$ transplantierten Rattenzellen, die eine Mortalität von 78 % der Empfänger verursachten (OWENS 23). Die Autoren gaben nicht an, in welchem Zeitintervall die Mäuse gestorben waren. Andererseits berichteten sie, daß die Rattenknochenmarkzellen am 14. Tag bereits abgestoßen waren.

Wir konnten uns nicht erklären, wie in diesem Fall eine so hohe Mortalität auftreten konnte. Die Autoren dieser Arbeit hatten die hohe Mortalität der Tiere als Folge einer Transplantatgegenwirtreaktion erklärt.

Die Anzahl der von uns durchgeführten Versuche im xenogenen System erschien uns ausreichend, um die erzielten Ergebnisse als glaubwürdig zu betrachten, nichtsdestoweniger aber merkwürdig. Nach der Transplantation von xenogenen Zellen, unabhängig davon, ob es sich um Milz- oder Knochenmarkzellen handelte, war die beobachtete Sterblichkeit im Endoxansystem sehr gering (nur 7 von insgesamt 78 transplantierten Mäusen starben), während die Sterblichkeitsrate im allogenen System sehr hoch war (100 % im Maus-Maus-System, 84 % im Ratte-Ratte-System).

Die geringe Mortalität im xenogenen System kann nicht die Folge einer Transplantatgegenwirtreaktion sein, da sämtliche klinische Zeichen einer akuten oder chronischen Sekundärkrankheit gefehlt haben. Außerdem waren zwischen dem 8. und 15. Tag die nur zu einem geringen Prozentsatz an-

gewachsenen Spenderzellen bereits abgestoßen, so wie der Spenderzellnachweis im Empfänger ergeben hatte.

Daß die Mäuse nicht infolge einer akuten Transplantatabstoßung gestorben waren, kann man ebenfalls ausschließen. Die akute Transplantatabstoßung, so wie sie von van BEKKUM (4) beschrieben wurde (Radiation Chimeras, S. 33), ist die Folge einer sehr raschen Erholung des Immunapparates der Empfänger, die mit einer subletalen Bestrahlungsdosis auf die Transplantatannahme vorbereitet waren. In diesen Fällen wurde ein "midlethal effect" oder "midlethal phenomenon" beobachtet, bei dem die Mehrzahl der Empfänger starb. Wie die Versuche der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, konnte man nach Vorbehandlung der Empfänger mit Endoxan und Transplantation xenogener Zellen keine Sensibilisierung gegen die Rattenantigene feststellen. Der Immunapparat der Empfänger war also zum Zeitpunkt der Abstoßung noch nicht erholt. Man kann also annehmen, daß die Mäuse an Infektionen oder an einer geringen Toxizität der angewandten Endoxandosis gestorben waren, denn es starb ja auch ein geringer Prozentsatz der Mäuse an der alleinigen Endoxanbehandlung mit 300 mg/kg KG, wie die Kontrollversuche in dieser Arbeit (S. 9) es gezeigt haben. Während Endoxan für die Annahme von allogenen Spenderzellen den Empfänger ausreichend vorbereitete, war die gleiche Endoxandosis für das Anwachsen der xenogenen Zellen ungenügend. Die Analyse dieses Phänomens hat uns in dieser Arbeit beschäftigt.

Zunächst habe ich versucht zu zeigen, daß die Rattenzellen in anderen experimentellen Modellen wohl im Stande waren, anzuwachsen und immunologisch aktiv zu werden, wofür auch in der Literatur Hinweise vorlagen. Über die Herstellung von heterologen Schimären berichteten VOS et al. (36), ZAALBERG (37) und SANTOS (31). In diesen Arbeiten waren die Empfänger mit einer letalen Bestrahlungsdosis auf die Transplantatannahme vorbereitet. Eine zusammenfassende Darstellung über die xenogene Transplantation in diesem experimentellen Modell findet man bei KOLLER und DAVIES (17), MONACO (21) und van BEKKUM (5).
Die therapeutische Wirkung der Rattenknochenmarkzellen wurde an dem Überleben der letalbestrahlten Mäuse sowie an dem Vorhandensein von Rattenzellen im peripheren Blut der Empfänger bewiesen (GENGOZIAN 13). NOWELL et al. (22) konnte ebenfalls zeigen, daß nach Bestrahlung der Mäuse mit 810 r und Transplantation von Rattenknochenmarkzellen das

Knochenmark der Empfänger zwischen dem 14. und 28. Tag vollständig mit Spenderzellen besiedelt war.

Die eigenen Ergebnisse stimmten mit den Literaturergebnissen überein. Die Rattenknochenmarkzellen haben den akuten Tod der Mäuse nach der Letalbestrahlung verhindert. Mit dem Test der alkalischen Phosphatase-positiven Zellen war es möglich, bis zum 100. Tag nach der Transplantation Spenderzellen nachzuweisen. Die protrahierte Sterblichkeit, die bei diesen Versuchen auftrat, ist typisch für eine chronische Sekundärkrankheit.

Die starke immunologische Aktivität der Rattenmilzzellen wurde ebenfalls im xenogenen System nach Letalbestrahlung der Empfänger nachgewiesen.

Die Mäuse, die Rattenmilzzellen nach Letalbestrahlung erhalten hatten, starben sogar noch eher als die nur bestrahlten Kontrollmäuse. Um sicher zu sein, daß der frühere Tod durch eine akute Sekundärkrankheit verursacht war, wurden in einem weiteren Versuch gegen Mäuseantigene vorsensibilisierte Rattenmilzzellen transplantiert. Wenn der Tod der Mäuse im ersten Fall durch eine immunologische Reaktion der Spenderzellen gegen Empfängerantigene verursacht war, so mußten die sensibilisierten Spenderzellen diese Reaktion im Sinne einer anamnestischen Reaktion sogar noch verstärken. Tatsächlich sind die Empfänger von sensibilisierten Zellen früher als die Empfänger der nichtsensibilisierten Rattenzellen gestorben. Hingegen konnten selbst vorsensibilisierte Rattenmilzzellen auf Endoxan-vorbehandelte Empfängermäuse nicht immunologisch aktiv werden.

Der akute Tod nach Transplantation von Rattenmilzzellen entspricht dem Vorhandensein eines pools von stark immunkompetenten Zellen, die beim Nagetier sich in der reifen Milz befinden, im Gegensatz zum Nagerknochenmark.

Auch in der Literatur gab es Hinweise, daß unter den Rattenmilzzellen stark immunkompetente Zellen sind. Im allogenen System konnte SANTOS zeigen, daß die Rattenmilzzellen eine Transplantatgegenwirtreaktion in inkompatiblen Rattenempfängern auslösen können, wenn diese mit Endoxan vorbehandelt waren (SANTOS 27).

Im Ratte-Ratte-System habe ich ähnliche Ergebnisse erzielt.

HESLOP (14) zeigte, daß die Injektion von 50 x $10^6$ parentalen Milzzellen in der Nierenkapsel von $F_1$-Ratten eine lokale Transplantatgegenwirtreaktion auslöst.
Über die Fähigkeit der Rattenmilz, die Immunantwort bei subletal bestrahlten Ratten zu restaurieren, wurde auch von D. D. GREGOR berichtet (GREGOR 12).
Im xenogenen System konnte SANTOS zeigen, daß die Mortalität von letalbestrahlten Mäusen, die mit Rattenknochenmark transplantiert wurden, erhöht werden konnte, wenn man gleichzeitig Rattenmilzzellen transplantierte.
Ein anderer Faktor, der bei der Xenotransplantation von Zellen berücksichtigt werden muß, ist die Anzahl der transplantierten Zellen.
Nach van BEKKUM sowie nach anderen Autoren muß man im xenogenen Ratte-Maus-System ungefähr zehnmal so viel Zellen als im allogenen System transplantieren, um eine Transplantatannahme zu erhalten (van BEKKUM, S. 22, 4).

In den Versuchen dieser Arbeit wurde diese Bedingung eingehalten. Die Ergebnisse der xenogenen Zelltransplantation nach der subletalen Endoxanvorbehandlung können auch deswegen nicht durch eine ungenügende Zellzahl erklärt werden, denn man erhielt mit der gleichen Zellzahl bei letalbestrahlten Empfängern langlebige Schimären und konnte je nach verwendeter Zellart eine akute oder chronische Transplantatgegenwirtreaktion auslösen. Das Anwachsen der Rattenzellen nach der subletalen Endoxanbehandlung konnte auch nicht verbessert werden, nachdem man Knochenmarkzellen mit Milzzellen kombiniert hatte und also insgesamt die Zellzahl von 80 Millionen auf 140 Millionen erhöht hatte.

Was die Eigenschaften der Spenderzellen betrifft, so wurde in genügenden Versuchssystemen gezeigt, daß sie die Bedingungen erfüllen, um in den Mäuseempfängern anzuwachsen, sofern diese mit Letalbestrahlung für die Transplantation vorbehandelt waren.

Was war nun der Unterschied zwischen der Letalbestrahlung der Empfänger und deren Vorbehandlung mit Endoxan?

Sollte die ungenügende Immunsupression der angewandten Endoxandosis dafür verantwortlich sein, so mußte die Erhöhung der Endoxandosis ein besseres Anwachsen der xenogenen Spenderzellen ermöglichen.

Das war tatsächlich der Fall, wie der Spenderzellnachweis nach 400 und 500 mg/kg KG Endoxanvorbehandlung gezeigt hatte. Aber selbst nach so hohen Endoxandosierungen kam es bei den Überlebenden zu einem Verdrängen der Spenderzellen und einem Ersatz von Spenderzellen durch die Empfängerzellen innerhalb der ersten 15 Tage. Durch die Erhöhung der Endoxandosis erhöhte man sowohl die immunsupressive als auch die zytostatische Wirkung der Empfängervorbehandlung. Ich dachte, daß die Untersuchung der Faktoren, die für das Angehen der Zellen wichtig waren, in zwei Systemen erfolgen konnte: einmal indem Endoxan mit einem Immunsupressivum kombiniert wurde, in diesem Fall mit ALS, und einmal indem Endoxan mit einer reinen zytostatischen Substanz verabreicht wurde, in dieser Arbeit mit Myleran.

Wenn die Abstoßungsreaktion der Rattenzellen nach der subletalen Vorbehandlung der Empfänger mit Endoxan kein immunologischer Vorgang war, wie die Ergebnisse es gezeigt haben, so kann man durch die Erhöhung der Immunsupression auch keine bessere Transplantatannahme erwarten. Andererseits konnte man nach den Ergebnissen von AISENBERG et al. (1) dennoch hoffen, daß eine zusätzliche Vorbehandlung der Empfänger mit ALS neben der üblicherweise gegebenen Endoxandosis von 300 mg/kg KG die Transplantatannahme begünstigen würde.

AISENBERG et al. (1) haben in ihrer Arbeit die Fähigkeit zu Antikörperbildung gegenüber Schaferythrocyten bei Mäusen, die mit Endoxan immunsuprimiert waren, untersucht.
Die Erholung der Antikörperbildung nach der Endoxanvorbehandlung war unabhängig davon, ob die erwachsenen Versuchsmäuse vor der Endoxangabe thymectomiert waren oder nicht. Daraus haben die Autoren den Schluß gezogen, daß Endoxan im Gegensatz zur Letalbestrahlung die "immunkompetenten Zellen" nicht eliminiert, sondern nur den pool der "Effector Lymphocyten" entleert.

Wenn man diese Feststellung mit den Erkenntnissen von MARTIN und MILLER (19) ergänzt, so könnte man sagen, daß Endoxan nicht auf die

antigenempfindlichen Zellen wirkt, also die Informationsübertragung zur Antikörperbildung nur vorübergehend schädigt. Hingegen wirkt es auf den efferenten Schenkel der Immunantwort, indem es die antikörperproduzierenden Zellen schädigt und dadurch den Empfänger nur vorübergehend immunsuprimiert.
Nachdem ALS einer funktionellen Thymectomie entspricht, denn es wirkt auf die thymusabhängigen Zellen und schädigt diese (MARTIN, MILLER, 19), konnte man annehmen, daß die Vorbehandlung mit ALS neben der Endoxanvorbehandlung die antigenempfindlichen Zellen, d. h. die Immunafferenz ausschalten würde.
Dadurch wäre es vielleicht möglich, daß die Rattenzellen dennoch länger im Empfänger überleben würden und daß eine gegenseitige Toleranzentstehung begünstigt wäre.

Diese Annahme konnte durch die von mir durchgeführten Versuche nicht bestätigt werden. Nach der Kombination von Endoxan mit ALS wuchsen die xenogenen Zellen nicht besser an als nach der Behandlung mit Endoxan allein.

Ebenso begünstigte die Antigenvorgabe das Überleben des Transplantates nicht wesentlich. Das gegebene Antigen vor der Endoxanbehandlung bewirkt eine Sensibilisierung eines spezifischen "clones".
Dieser stellt nach der Theorie von BURNET eine Zellpopulation dar, die nur gegen das gegebene Antigen spezifisch immunkompetent wirken kann. Die sensibilisierten Zellen, die eine Immunantwort starten wollen, teilen sich schneller als nichtsensibilisierte Zellen. Da Endoxan auf Zellen in Teilung im stärkeren Maße wirkt als auf ruhende Zellen, denn es hemmt bekanntlich die DNS-Synthese, wird nach der Endoxanbehandlung und vorausgegangener Sensibilisierung dieser spezifische Zellpool im größeren Maße zerstört.
Also unterdrückt die Antigengabe vor Endoxan ebenfalls die Immunafferenz im stärkeren Maße als Endoxan alleine. Dennoch überlebten die xenogenen Zellen, wie die eigenen Versuche gezeigt haben, nach Endoxan und Antigenvorgabe nicht länger als 15 Tage.

Die Erhöhung der Immunsupression schaffte keine bessere Bedingung für das Angehen der Rattenzellen, so daß die Annahme einer ungenügenden Immunsupression als Ursache für die Abstoßung der Rattenzellen sich nicht bestätigte.

Deswegen wurde in der Empfängervorbehandlung Endoxan mit einem Zytostatikum kombiniert, das keine wesentliche immunsupressive Wirkung besitzt. Als zytostatische Substanz wurde Myleran gewählt.

Diese Kombination von Endoxan und Myleran wurde in einem anderen experimentellen Modell von SANTOS (29) angewandt. Die von ihm gegebene Dosis war allerdings letal. Dadurch konnte die endogene Regenerationsfähigkeit der hämopoetischen Zellen so stark unterdrückt werden, daß man die Mäuse zur Zählung von colony forming units (CFU) verwenden konnte. Sonst war die Zählung der colony forming units nur nach Letalbestrehlung der Empfänger möglich gewesen.
Den Vorteil der medikamentösen Vorbehandlung für die Zählung von CFU sah SANTOS in der technisch einfacheren Durchführung dieser Vorbehandlung, die auch jedem kleineren Laboratorium zugänglich sein kann (SANTOS 29).

Myleran wurde auch bei Ratten als Vorbehandlung für die Zelltransplantation angewandt, allerdings nur im syngenen System. Die Transplantation von syngenen Knochenmarkzellen gewährte hämopoetischen Schutz in 100% der supraletal vorbehandelten Ratten (WESTON 39).

Auch DUNN und ELSON haben gezeigt, daß Myleran eine Knochenmarkaplasie der Empfänger induziert, indem es auf die frühen "Stammzellen" wirkt und deren Anzahl stark reduziert (DUNN und ELSON 9).

Daß die immunsupressive Wirkung der gegebenen Mylerandosis in den eigenen Versuchssystemen auf jeden Fall zu vernachlässigen war, habe ich dadurch gezeigt, daß die alleinige Gabe von 40 mg/kg KG Myleran den Empfänger weder für die allogene noch für die xenogene Transplantatannahme vorbereitet hatte. Syngene Transplantate wurden hingegen, wie man es aus den Literaturergebnissen weiß, akzeptiert.

Nach der Kombinationsbehandlung von Endoxan und Myleran konnte man dann tatsächlich ein besseres Anwachsen der xenogenen Zellen beobachten. Die xenogenen Milzzellen waren, wie gezeigt, immunologisch aktiv geworden und haben den Tod der Empfänger verursacht. Nach der Transplantation von Rattenknochenmarkzellen konnte man Spenderzellen bis zum 30. Tag im Empfänger nachweisen, im Gegensatz zu den nur mit Endoxan in Höchstdosen vorbehandelten Empfängern, bei denen Spenderzellen am

15. Tag nicht mehr nachweisbar waren. Die Ergebnisse bei Vorbehandlung der Empfänger mit Endoxan und Myleran waren den Bestrahlungsergebnissen im Letalbereich ähnlich. Warum die Empfänger nach der medikamentösen Kombinationstherapie und Transplantation von Rattenknochenmarkzellen verhältnismäßig früh gestorben waren, kann man aus den bisherigen Versuchen noch nicht eindeutig erklären.

Aus den Ergebnissen der Transplantation von Zellen nach Endoxan und Myleran kann man die Arbeitshypothese aufstellen, daß bei der Transplantation von Zellen im Gegensatz zu der Organtransplantation die Immunsupression der Empfänger notwendig, aber nicht ausreichend ist.

Die Transplantation von mehreren Nieren z. B. auf einen immunsuprimierten Empfänger ist denkbar. Der Transplantation von Zellen hingegen ist durch die Größe des schon vorhandenen Zellpools im Empfänger eine Grenze im Sinne einer Rückkoppelung gesetzt.

In dem Falle der Zelltransplantation ist die Übertragung dieser auch von nicht immunologischen Faktoren abhängig.

FORD stellte fest, daß syngene CBA/T6-Knochenmarkzellen in einem nicht vorbehandelten CBA-Empfänger nicht anwachsen. Wurde der Empfänger letal bestrahlt, so wurde sein lymphopoetischer und hämopoetischer Raum von CBA/T6-Zellen besiedelt (FORD 10).

Die Unterdrückung des Immunapparates allein reicht nicht aus, um das Anwachsen eines Zelltransplantates im Empfänger zu ermöglichen. Nach Antilymphocytenserum beispielsweise kann die Transplantation von Zellen nicht erfolgen. Obwohl nach einer ALS-Behandlung ein reeller, ausgedrückt durch die Lymphopenie, oder ein funktioneller Mangel an immunkompetenten Lymphocyten besteht, betrifft die Schädigung wahrscheinlich in erster Linie zirkulierende Zellen des Blutes. Die Regenerationsfähigkeit der Stammzellen ist dabei nicht wesentlich betroffen (DEMAN 8).

Besteht neben der Immunsupression ein zentraler Zellmangel, wie im Falle der kongenitalen anämischen Mäuse vom genetischen Stamm $W^VW^V$, so ist die Transplantation von allogenen hämopoetischen fetalen Zellen imstande, die Anämie zu bessern. Die Erythrocyten in der Peripherie sind ausschließlich vom Spendertyp (SELLER 33).

Die erfolgreiche Transplantation von Zellen nach alleiniger ALS-Vorbehandlung der Empfänger in der Klinik, über die MATHE und AMIEL berichteten, läßt sich auch nur aus der Tatsache erklären, daß die Patienten sich schon in der splastischen Phase nach mehreren Behandlungsversuchen einer chronischen myeloischen Leukämie befanden. Bei diesen Patienten lag ein vollständiger Mangel an Stammzellen vor, der durch die kompatiblen Knochenmarkzellen ersetzt werden konnte (MATHE 20).

Diese Behandlung entspricht dem von FLOERSHEIM vorgeschlagenen experimentellen Modell: Mäuse, die mit Dimethylmyleran in einer supraletalen Dosis vorbehandelt waren, starben nach Übertragung von allogenem Knochenmark in einer akuten aplastischen Krise. Das Dimethylmyleran, ein Derivat des Mylerans, ist stark zytostatisch wirksam, ohne immunsupressive Eigenschaften zu haben. Deswegen wurden die allogenen Zellen auch abgestoßen. Erst nach einer zusätzlichen Behandlung des Empfängers mit ALS wuchs das allogene Knochenmark an und verhinderte den akuten Zelltod (FLOESHEIM 11).

Aber auch ohne Vorbehandlung der Empfänger können Zellen transplantiert werden, wie z. B. aus dem Fall eines Patienten mit Swisstype Agammaglobulinemia ersichtlich ist. Es handelte sich hierbei um eine Immunopatie mit einem kongenitalen Mangel von Stammzellen.

KOENING et al. transplantierte bei diesem Patienten, einem 12 Monate alten Kind, Knochenmark eines kompatiblen Geschwisters. Das Kind zeigte anschließend normale Gammaglobulinwerte im Plasma, die Zeichen der chronischen Infektion verschwanden (KOENING et al. 16).

Aus den hier gebrachten Beispielen sowie aus den eigenen Ergebnissen sieht man, daß man unabhängig davon, ob man kompatible oder inkompatible Zellen transplantiert, im Empfänger Platz geschaffen haben muß, damit die übertragenen Zellen ausdifferenzieren können. Bei der Transplantation von gewebsunverträglichen Zellen ist außerdem sicher notwendig, daß der Empfänger immunsuprimiert wird.

Den Begriff des "Platzes" habe ich wörtlich aus dem Englischen übersetzt, wo man von "room" oder "space" spricht (TAUB 34).

Warum die allogenen Zellen bei der gleichen Vorbehandlung des Empfängers mit 300 mg/kg KG Endoxan genügend Platz haben, um ausdifferen-

zieren zu können und um den Empfänger zu besiedeln, während die xenogenen Zellen abgestoßen werden, würde ich nur sehr vorsichtig zu erklären versuchen.

Vielleicht wachsen die allogenen Zellen in dem verwandteren allogenen Empfängermilieu leichter als die xenogenen Zellen. Sie könnten darüber hinaus durch eine stärkere und vielleicht sich schneller aufbauende Transplantatgegenwirtreaktion sich selbst Platz zum Wachsen schaffen. Daß die Zellen durch die Transplantatgegenwirtreaktion sich Platz zum Wachsen schaffen können, entnimmt man aus der Transplantation von parentalen Zellen auf unvorbehandelte $F_1$-Empfänger. In diesem experimentellen Modell können die Empfänger immunologisch nicht gegen die parentalen Zellen wirken, diese hingegen schaffen sich durch die immunologische Aktivität gegen die Empfängerantigene Raum zum Anwachsen (COLE und GARVER 7).

Aus Ergebnissen von VALERIONTE et al. zeigt sich, daß nach Endoxan die Empfängerhämopoese sich rasch erholte. Die Erholung erfolgte schneller als nach vergleichbaren Bestrahlungsdosen (VALERIOTE et al. 38).

Die Rattenzellen, als die genetisch fremderen, wurden durch den Zelldruck der Empfängerhämopoese vielleicht eher als die allogenen Zellen verdrängt. Es wäre auch denkbar, daß bei gleichem Zelldruck die xenogenen Zellen deswegen schneller verdrängt werden, weil sie im xenogenen Empfänger nur in größeren Zellverbänden gedeihen als allogene Zellen. Bei gleichem Zelldruck von seiten des Empfängers würde dann schneller die Mindestzellzahl einer xenogenen Spenderzellinsel unterschritten.

Nach Endoxan und Myleran war die periphere Leukopenie ausgeprägter, sie erholte sich langsamer als die Leukopenie nach Endoxan alleine.
Wenn man annimmt, daß die periphere Leukopenie mit einem größeren Stammzellmangel korreliert, so wird unter der bereits erwähnten Annahme, daß die Zellen Platz zum Ausdifferenzieren brauchen, verständlich, warum die Rattenzellen nach der Kombinationsbehandlung von Endoxan mit Myleran anwachsen konnten, nicht dagegen nach der alleinigen Endoxanbehandlung.

# ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, xenogene hämopoetische Rattenzellen auf Mäuse zu übertragen, die mit 300 mg/kg KG Endoxan vorbehandelt waren, eine Behandlung, an der ohne darauffolgende Transplantation nur 1 von 15 Tieren gestorben war. Über die Annahme von allogenen Zellen bei dieser Empfängerbehandlung hatte SANTOS 1966 berichtet.

Das Anwachsen der xenogenen Zellen im Empfänger wurde mit cytogenetischen und cytochemischen Methoden verfolgt, was im Gegensatz zu anderen Spender-Empfänger-Kombinationen im Ratte-Maus-System leicht möglich ist.

Ein weietres Indiz für das Anwachsen von immunkompetenten Zellen ist das Auftreten einer Sekundärkrankheit. Als Kriterien hierfür galten die Überlebensrate der Mäuse, der Gewichtsverlauf und ihr klinischer Aspekt.

Überraschenderweise überlebten 71 von 78 endoxanvorbehandelten und mit xenogenen Zellen transplantierten Mäusen. Man konnte also annehmen, daß die Rattenzellen abgestoßen wurden, ohne eine immunologische Aktivität im Empfänger entfaltet zu haben.

Der Immunapparat der Mäuse nach der Abstoßungsreaktion wurde untersucht. Weder in der humoralen noch in der zellulären Immunabwehr wurde eine Sendibilisierung gegenüber Rattenantigene festgestellt.

Eine ungenügende Immunkompetenz der Rattenknochenmark- und Rattenmilzzellen konnte ausgeschlossen werden, denn die gleichen Zellen wurden immunologisch aktiv in Mäusen, die mit einer letalen Bestrahlungsdosis auf die Transplantatannahme vorbereitet wurden. Ebenfalls zeigte die aufgetretene akute Sekundärkrankheit bei endoxanvorbehandelten Rattenempfängern von allogenen Milzzellen, daß in diesem System die Rattenzellen angenommen wurden.

Nur im xenogenen System - im Gegensatz zum allogenen System - reicht also die Empfängervorbehandlung mit Endoxan nicht aus, um ein Einwachsen von xenogenen Zellen zu ermöglichen.

Die sich zunächst anbietende Möglichkeit einer ungenügenden Immunsupression in der Empfängervorbehandlung konnte ausgeschlossen werden, da nach einer Kombinationsvorbehandlung von Endoxan mit ALS die xenogenen Zellen nicht besser ausdifferenzierten als nach der alleinigen Endoxanbehandlung.

Eine ausreichende Vorbehandlung für die xenogene Zelltransplantation stellte hingegen die Kombination von Endoxan mit 40 mg/kg KG Myleran (Busulfan) dar, ein Medikament, das stark myelotoxisch wirksam ist, aber keine immunsupressive Wirkung in unseren Versuchssystemen besitzt.

Diese Ergebnisse berechtigten uns, die Arbeitshypothese aufzustellen, daß für die Annahme eines Zelltransplantates nicht nur die Unterdrückung der Immunabwehr der Empfänger wichtig ist. Neben der Immunsupression muß man im Empfängerknochenmark Raum schaffen, damit die übertragenen Zellen sich ansiedeln können. Während im allogenen System Endoxan den Zellen genügend Raum zum Ausdifferenzieren schafft, mußte im xenogenen System, also bei der Transplantation von genetisch fremderen Zellen, der Raum durch die zusätzliche Behandlung mit Myleran vergrößert werden. Den fremden Zellen wird durch Myleran zusätzlich Platz zum Ausdifferenzieren bereitgestellt, da Myleran im Empfängerknochenmark den Stammzellpool stark reduziert.

# LITERATURVERZEICHNIS

1. AISENBERG, A.C., DAVIS, C.: Thymus and recovery from cyclophosphamideinduced tolerance to sheep erythrocytes, J. of Exp. Med., 35 - 44, 12. 2. 1968.

2. AMOS, D.B.: Histocompatibilitytesting. Munksgaard, Copenhagen, 151, 1965.

3. BALNER, H.: Secondary disease in rat radiation chimeras. J. of nat. Cancer Institute 32, 419 - 459, 1964.

4. van BEKKUM, D.W., de VRIES, M.J.: Radiation Chimeras, Logos Press, Academic Press, 1967.

5. van BEKKUM, D.W., VOS, O.: Immunological aspects of homo- and heterologous bone marrow transplantation in irradiated animals. J. of Cell. Comp. Physiol. 50, 139 - 156, 1957.

6. BROCK, R.: Artikel 1245, Endoxan Sammelreferat 9, ASTA Werke, Chemische Fabrik, Brackwede, 9 - 12, 1969.

7. COLE, C.J., GARVER, R.M.: Studies on the mechanism of secondary disease; The parent - $F_1$ hybrid radiation chimera. Radiation Research 12, 398 - 408, 1960.

8. DEMAN, M., FRENKEL, E.P.: Mode of action of anti-lymphocyte globulin. Immunology 14, 115 - 126, 1968.

9. DUNN, C.D., ELSON, L.A.: The comparative effect of busulphan (Myleran) and aminochloralbucil on haemopoietic colony forming units in the rat. Cell and Tissiue Kinetics, Vo. 3, No. 2, 131 - 141, 1970.

10. FORD, C.E., HAMERTON, I.L., et al.: Cytological identification of radiation chimeras. Nature 177, 452 - 454, 1956.

11. FLOERSHEIM, G.L.: Bone marrow transplantation after ALS and lethal chemotherapy. Nature, Vol. 222, 854 - 857, 1969.

12. GREGOR, D.D., CULLAGH, J., GOWANS, J.L.: Role of lymphocyte in antibody formation; Restauration of the haemolysin response in x-irradiated rats with lymphocytes from normal and immunologically tolerant donors. Proc. Roy. Soc. Vol. 168 B, 229 - 243, 1967.

13. GENGOZIAN, N., MAKINODAN, T.: Mortality of mice as affected by the variation of the x-ray dose and number of nucleated rat bone marrow cells injected. Cancer Res. 17, 970 - 975, 1957.

14. HESLOP, B.F.: Histocompatibility antigens in the rat: The $AS_2$ strain in relation to the AS, BS and HS strains. Exp. Biol. Med. Sci. Vol. XLVI, 480 - 491, 1968.

15. KAPLOW, L.: Cytochemistry of leucocyte alkaline phosphatase; Use of complex naphtol AS phosphates in Azo-Dye coupling techniques. Am. J. of Clin. Pathol., Vol. 39, No. 5, 439 - 449, 1963.

16. KOENING, J., van BEKKUM, D.W., et al.: Transplantation of bone marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. Lancet, 1223 - 1227, 21. 6. 1969.

17. KOLLER, P.C., DAVIES, SHEILA, M.A., DOAK: Radiation chimeras. Advances in Cancer Research 6, 181 - 288, 1961.

18. MAKINODAN, T.: Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow. Proc. Soc. of Exper. Biol. and Med. 92, 174 - 179, 1956.

19. MARTIN, W.J., MILLER, A.P.: Cell to cell interaction in the immune response. J. of Exp. Med. 128, No. 4, 855 - 874, 1968.

20. MATHE, G., AMIEL, J.L.: Greffe de moelle osseuse allogénique chez l'homme prouvée par six marqueurs antigéniques après conditionnement du receveur et du donneur par le sérum antilymphocytaire. Révue francaise d'études cliniques et biologiques, No. 10, Vol. XIII, 1025 - 1027, 1968.

21. MONACO, A., RUSSEL, P.S.: The biology of tissue transplantation. Little, Brown and Company, Boston, 1964.

22. NOWELL, P.C., et al.: Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. Cancer Research 16, 258 - 261, 1956.

23. OWENS, A.H., SANTOS, G.: The induction of graft-versus-host disease in mice treated with cyclophosphamide. J. of Exp. Med. Vol. 128, No. 2, 277 - 291, 1968.

24. PEATMAN, J.G.: Introduction to applied statistics. Harper & Row Publishers, 1963.

25. REEMTSMA, K.: Heterotransplantation. Transpl. Proc. Vol. I, No. 1, 252 - 255, 1969.

26. SANTOS, G.: Immunosupressive drugs I. Fed. Proc. 426, 907 - 915, 1967.

27. SANTOS, G., OWENS, A.H.: Production of graft-versus-host disease in the rat and its treatment with cytotoxic agents. Nature, Vol. 210, No. 5032, 139 - 140, 1966.

28. SANTOS, G.: Syngeneic and allogeneic marrow transplants in the cyclophosphamide pretreated rat. Advance in Transplantation, Paris, Editors Dausset et al., Munksgaard, 427 - 430, 1967.

29. SANTOS, G., HAGHSHENASS, M.: Cloning of syngeneic hematopoietic cells in the spleens of mice and rats pretreated with cytotoxic drugs. Blood, Vol. 32, No. 4, 629 - 637, 1968.

30. SANTOS, G., OWENS, A.H.: Adoptive transfer of immunologically competent cells I. Quantitative studies of antibody formation by syngeneic spleen cells in the cyclophosphamide pretreated mouse. Bull. Hopkins Hosp. Vol. 118, 127 - 139, 1966.

31. SANTOS, G., COLE, L.J.: Effects of donnor and host lymphoid and myeloid tissue injections in lethally x-irradiated mice treated with rat bone marrow. J. of the Nat. Cancer Inst. 21, 279 - 293, 1958.

32. SANTOS, G., OWENS, A.H.: Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice. Transplantation Proc. Vol. 1, No. 1, 44 - 46, 1969.

33. SELLER, M.J., POLLANI, P.E.: Transplantation of allogeneic hemopoietic tissue in adult anemic mouse of the W series using ALS. Lancet, 18 - 21, 4. 1. 1969.

34. TAUB, G.: Cooperative group on bone marrow transplantation in man - Discussion, Paris 1969, Report of Work Sessions held June 16 - 17, 1969, at Hôpital Paul-Brousse, Villejuif, Paris, France.

35. THIERFELDER, S., MÖLLER, KIMURA: Die Wirkung von heterologer Knochenmarkübertragung bei supraletal bestrahlten Mäusen. Blut, Vol. XV, 225 - 229, 1967.

36. VOS, O., de VRIES, M.J., van BEKKUM, D.W.: Transplantation of homologous and heterologous lymphoid cells in x-irradiated and non irradiated mice. J. of Nat. Cancer Instit. 23, 53 - 73, 1959.

37. ZAALBERG, O.B., VOS, O., van BEKKUM, D.W.: Surviving of rat skin grafts in mice. Nature 180, 238 - 239, 1957.

38. VALERIOTE, DAVID, C., COLLINS, et al.: Hematological recovery in the mouse following single doses of gamma radiation and cyclophosphamide. Rad. Research 33, No. 3, 501 - 511, 1968.

39. WESTON, J.K., MAXWELL, R.E., et al.: Curative effect of rat bone marrow transfusions in aplastic (severe hypoplastic) anemia in rats induced by Myleran, a radiomimetic chemical. Federation Proc. 16, 377, 1957.

# ANHANG

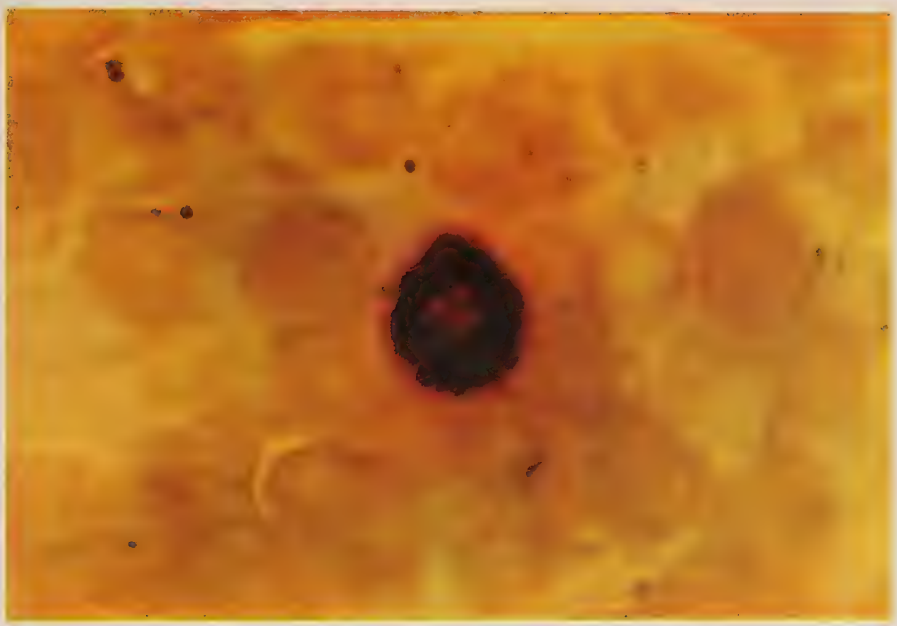


Bild 1: Rattengranulocyt

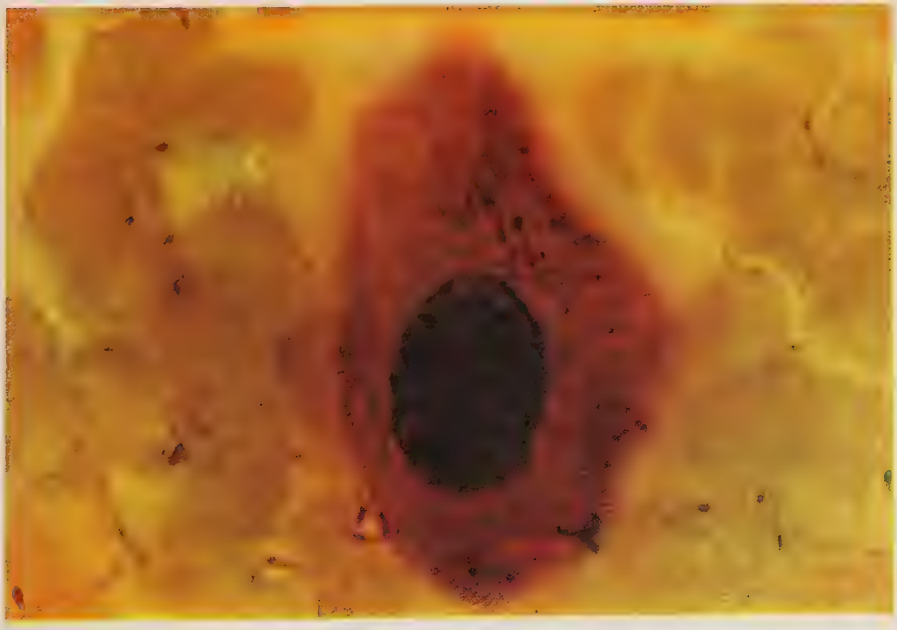


Bild 2: Epithelzelle der Maus

Bild 4: Ratte mit Sekundärkrankheit
neben gesunder Kontrollratte

# LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| 8. 3. 1945 | geboren als Tochter des Filmkaufmanns Manole Hellmann und der Rechtsanwältin Margot Hellmann, geb. Wittner. |
| 1951 - 1955 | Besuch der Volksschule in Bukarest/Rumänien. |
| 1955 - 1960 | Besuch der Realschule in Bukarest/Rumänien. |
| 1960 - 1964 | Besuch der Mädchen-Oberrealschule St. Anna in München. |
| 1964 | Reifeprüfung in München. |
| 1964 - 1967 | Vorklinisches Studium an der Universität München. |
| 23. 2. 1967 | Physikum, Note: sehr gut. |
| 1967 - 1970 | Klinisches Studium an der Universität München und an der Med. Fakultät in Paris. |
| 17. 12. 1970 | Staatsexamen, Note: sehr gut. |
| Nov. 1968 bis Febr. 1970 | Doktorarbeit in der Abteilung für Immunologie im Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg. |
| 11. 2. 1971 | Examen des ECFMG. |